

⑫ 公表特許公報(A)

平5-502727

⑬ 公表 平成5年(1993)5月13日

⑭ Int. Cl.⁵G 01 N 27/416
G 06 F 15/42

識別記号

Z

庁内整理番号

7060-5L
6923-2J
6923-2J

審査請求 未請求

予備審査請求 有

G 01 N 27/46

3 3 6 B
3 3 6 C

部門(区分) 6(1)

(全 8 頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンシング機器および方法

⑯ 特 願 平3-502861

⑰ 出 願 平2(1990)12月14日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)5月13日

⑲ 国際出願 PCT/US90/07504

⑳ 国際公開番号 WO91/09373

㉑ 国際公開日 平3(1991)6月27日

優先権主張 ㉒ 1989年12月15日 ㉓ 米国(U S) ㉔ 451,309

⑳ 発 明 者 ホワイト ブラッドリイ イ アメリカ合衆国 インディアナ州 46077 ジオンズビル ジェームズ コート 1371

㉑ 出 願 人 ベーリンガー マンハイム コ アメリカ合衆国 インディアナ州 46250 インディアナポリス
ーボレーション ヘイグ ロード 9115

㉒ 代 理 人 弁理士 藤村 元彦 外1名

㉓ 指 定 国 A T(広域特許), B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

請求の範囲 (翻訳文)

1. 反応域を流れる電流が所定のコットレル電流との関係に従って変化しているかどうかを判定するためのバイオセンサシステムであって、

分析対象反応体を有する反応域及び電極手段を含むテストセルと、

分析対象物を含有するサンプルを前記反応域に入れた後で複数の測定時間において前記反応域を流れる電流流取り値を複数回測定する手段と、

連続する2つの測定時間について、一方の測定時間の平方根を後続の測定時間の平方根で割ったものの逆数を示す比較定数を少なくとも1つ記憶する手段と、

前記対をなして連続する2つの測定時間において測定された電流流取り値の比を算出する手段と、

前記電流流取り値の前記比と、前記対をなして連続する2つの測定時間の前記比較定数と、の類似性を比較して表示する手段と、

を含むことを特徴とするシステム。

2. 前記記憶手段は複数の連続する測定時間についての複数の比較定数を含む、前記算出手段は前記連続する測定時間にて測定された電流流取り値の比を算出し、前記比較手段は前記比を対応する比較定数と比較し、前記システムは前記電流流取り値が前記コットレル電流との関係に従っ

ているかどうかを判定することを特徴とする請求項1記載のシステム。

3. 前記テストセルは反応域で伸長する2つの電極を含み、前記電極は分析対象反応体を含有する層によって覆われていることを特徴とする請求項2記載のシステム。

4. 前記サンプルが前記反応域に入れられる前に検出オートドロップ電圧を電極に印加する手段と、

前記オートドロップ電圧を前記電極から除去するとともにバイオセンシングテストシーケンスを開始させる出力信号を発生させ、前記反応域に前記サンプルが存在することを示す電流スパイクを前記テストセルから検出する手段と、

を含むことを特徴とする請求項3記載のシステム。

5. 反応域を流れて、その反応域の分析対象物の濃度に依存するとともに、コットレル方程式にて定義された形状を有する曲線の一つに従って変化する電流*i*を測定するシステムにおいて、前記電流がコットレル方程式に従って変化していることを判定する方法であって、

(a) 電流値*i*₁、*i*₂、*i*₃、*i*₄、*i*₅、*i*₆、*i*₇、*i*₈、*i*₉、*i*₁₀、*i*₁₁、*i*₁₂、*i*₁₃、*i*₁₄、*i*₁₅、*i*₁₆、*i*₁₇、*i*₁₈、*i*₁₉、*i*₂₀、*i*₂₁、*i*₂₂、*i*₂₃、*i*₂₄、*i*₂₅、*i*₂₆、*i*₂₇、*i*₂₈、*i*₂₉、*i*₃₀、*i*₃₁、*i*₃₂、*i*₃₃、*i*₃₄、*i*₃₅、*i*₃₆、*i*₃₇、*i*₃₈、*i*₃₉、*i*₄₀、*i*₄₁、*i*₄₂、*i*₄₃、*i*₄₄、*i*₄₅、*i*₄₆、*i*₄₇、*i*₄₈、*i*₄₉、*i*₅₀、*i*₅₁、*i*₅₂、*i*₅₃、*i*₅₄、*i*₅₅、*i*₅₆、*i*₅₇、*i*₅₈、*i*₅₉、*i*₆₀、*i*₆₁、*i*₆₂、*i*₆₃、*i*₆₄、*i*₆₅、*i*₆₆、*i*₆₇、*i*₆₈、*i*₆₉、*i*₇₀、*i*₇₁、*i*₇₂、*i*₇₃、*i*₇₄、*i*₇₅、*i*₇₆、*i*₇₇、*i*₇₈、*i*₇₉、*i*₈₀、*i*₈₁、*i*₈₂、*i*₈₃、*i*₈₄、*i*₈₅、*i*₈₆、*i*₈₇、*i*₈₈、*i*₈₉、*i*₉₀、*i*₉₁、*i*₉₂、*i*₉₃、*i*₉₄、*i*₉₅、*i*₉₆、*i*₉₇、*i*₉₈、*i*₉₉、*i*₁₀₀、*i*₁₀₁、*i*₁₀₂、*i*₁₀₃、*i*₁₀₄、*i*₁₀₅、*i*₁₀₆、*i*₁₀₇、*i*₁₀₈、*i*₁₀₉、*i*₁₁₀、*i*₁₁₁、*i*₁₁₂、*i*₁₁₃、*i*₁₁₄、*i*₁₁₅、*i*₁₁₆、*i*₁₁₇、*i*₁₁₈、*i*₁₁₉、*i*₁₂₀、*i*₁₂₁、*i*₁₂₂、*i*₁₂₃、*i*₁₂₄、*i*₁₂₅、*i*₁₂₆、*i*₁₂₇、*i*₁₂₈、*i*₁₂₉、*i*₁₃₀、*i*₁₃₁、*i*₁₃₂、*i*₁₃₃、*i*₁₃₄、*i*₁₃₅、*i*₁₃₆、*i*₁₃₇、*i*₁₃₈、*i*₁₃₉、*i*₁₄₀、*i*₁₄₁、*i*₁₄₂、*i*₁₄₃、*i*₁₄₄、*i*₁₄₅、*i*₁₄₆、*i*₁₄₇、*i*₁₄₈、*i*₁₄₉、*i*₁₅₀、*i*₁₅₁、*i*₁₅₂、*i*₁₅₃、*i*₁₅₄、*i*₁₅₅、*i*₁₅₆、*i*₁₅₇、*i*₁₅₈、*i*₁₅₉、*i*₁₆₀、*i*₁₆₁、*i*₁₆₂、*i*₁₆₃、*i*₁₆₄、*i*₁₆₅、*i*₁₆₆、*i*₁₆₇、*i*₁₆₈、*i*₁₆₉、*i*₁₇₀、*i*₁₇₁、*i*₁₇₂、*i*₁₇₃、*i*₁₇₄、*i*₁₇₅、*i*₁₇₆、*i*₁₇₇、*i*₁₇₈、*i*₁₇₉、*i*₁₈₀、*i*₁₈₁、*i*₁₈₂、*i*₁₈₃、*i*₁₈₄、*i*₁₈₅、*i*₁₈₆、*i*₁₈₇、*i*₁₈₈、*i*₁₈₉、*i*₁₉₀、*i*₁₉₁、*i*₁₉₂、*i*₁₉₃、*i*₁₉₄、*i*₁₉₅、*i*₁₉₆、*i*₁₉₇、*i*₁₉₈、*i*₁₉₉、*i*₂₀₀、*i*₂₀₁、*i*₂₀₂、*i*₂₀₃、*i*₂₀₄、*i*₂₀₅、*i*₂₀₆、*i*₂₀₇、*i*₂₀₈、*i*₂₀₉、*i*₂₁₀、*i*₂₁₁、*i*₂₁₂、*i*₂₁₃、*i*₂₁₄、*i*₂₁₅、*i*₂₁₆、*i*₂₁₇、*i*₂₁₈、*i*₂₁₉、*i*₂₂₀、*i*₂₂₁、*i*₂₂₂、*i*₂₂₃、*i*₂₂₄、*i*₂₂₅、*i*₂₂₆、*i*₂₂₇、*i*₂₂₈、*i*₂₂₉、*i*₂₃₀、*i*₂₃₁、*i*₂₃₂、*i*₂₃₃、*i*₂₃₄、*i*₂₃₅、*i*₂₃₆、*i*₂₃₇、*i*₂₃₈、*i*₂₃₉、*i*₂₄₀、*i*₂₄₁、*i*₂₄₂、*i*₂₄₃、*i*₂₄₄、*i*₂₄₅、*i*₂₄₆、*i*₂₄₇、*i*₂₄₈、*i*₂₄₉、*i*₂₅₀、*i*₂₅₁、*i*₂₅₂、*i*₂₅₃、*i*₂₅₄、*i*₂₅₅、*i*₂₅₆、*i*₂₅₇、*i*₂₅₈、*i*₂₅₉、*i*₂₆₀、*i*₂₆₁、*i*₂₆₂、*i*₂₆₃、*i*₂₆₄、*i*₂₆₅、*i*₂₆₆、*i*₂₆₇、*i*₂₆₈、*i*₂₆₉、*i*₂₇₀、*i*₂₇₁、*i*₂₇₂、*i*₂₇₃、*i*₂₇₄、*i*₂₇₅、*i*₂₇₆、*i*₂₇₇、*i*₂₇₈、*i*₂₇₉、*i*₂₈₀、*i*₂₈₁、*i*₂₈₂、*i*₂₈₃、*i*₂₈₄、*i*₂₈₅、*i*₂₈₆、*i*₂₈₇、*i*₂₈₈、*i*₂₈₉、*i*₂₉₀、*i*₂₉₁、*i*₂₉₂、*i*₂₉₃、*i*₂₉₄、*i*₂₉₅、*i*₂₉₆、*i*₂₉₇、*i*₂₉₈、*i*₂₉₉、*i*₃₀₀、*i*₃₀₁、*i*₃₀₂、*i*₃₀₃、*i*₃₀₄、*i*₃₀₅、*i*₃₀₆、*i*₃₀₇、*i*₃₀₈、*i*₃₀₉、*i*₃₁₀、*i*₃₁₁、*i*₃₁₂、*i*₃₁₃、*i*₃₁₄、*i*₃₁₅、*i*₃₁₆、*i*₃₁₇、*i*₃₁₈、*i*₃₁₉、*i*₃₂₀、*i*₃₂₁、*i*₃₂₂、*i*₃₂₃、*i*₃₂₄、*i*₃₂₅、*i*₃₂₆、*i*₃₂₇、*i*₃₂₈、*i*₃₂₉、*i*₃₃₀、*i*₃₃₁、*i*₃₃₂、*i*₃₃₃、*i*₃₃₄、*i*₃₃₅、*i*₃₃₆、*i*₃₃₇、*i*₃₃₈、*i*₃₃₉、*i*₃₄₀、*i*₃₄₁、*i*₃₄₂、*i*₃₄₃、*i*₃₄₄、*i*₃₄₅、*i*₃₄₆、*i*₃₄₇、*i*₃₄₈、*i*₃₄₉、*i*₃₅₀、*i*₃₅₁、*i*₃₅₂、*i*₃₅₃、*i*₃₅₄、*i*₃₅₅、*i*₃₅₆、*i*₃₅₇、*i*₃₅₈、*i*₃₅₉、*i*₃₆₀、*i*₃₆₁、*i*₃₆₂、*i*₃₆₃、*i*₃₆₄、*i*₃₆₅、*i*₃₆₆、*i*₃₆₇、*i*₃₆₈、*i*₃₆₉、*i*₃₇₀、*i*₃₇₁、*i*₃₇₂、*i*₃₇₃、*i*₃₇₄、*i*₃₇₅、*i*₃₇₆、*i*₃₇₇、*i*₃₇₈、*i*₃₇₉、*i*₃₈₀、*i*₃₈₁、*i*₃₈₂、*i*₃₈₃、*i*₃₈₄、*i*₃₈₅、*i*₃₈₆、*i*₃₈₇、*i*₃₈₈、*i*₃₈₉、*i*₃₉₀、*i*₃₉₁、*i*₃₉₂、*i*₃₉₃、*i*₃₉₄、*i*₃₉₅、*i*₃₉₆、*i*₃₉₇、*i*₃₉₈、*i*₃₉₉、*i*₄₀₀、*i*₄₀₁、*i*₄₀₂、*i*₄₀₃、*i*₄₀₄、*i*₄₀₅、*i*₄₀₆、*i*₄₀₇、*i*₄₀₈、*i*₄₀₉、*i*₄₁₀、*i*₄₁₁、*i*₄₁₂、*i*₄₁₃、*i*₄₁₄、*i*₄₁₅、*i*₄₁₆、*i*₄₁₇、*i*₄₁₈、*i*₄₁₉、*i*₄₂₀、*i*₄₂₁、*i*₄₂₂、*i*₄₂₃、*i*₄₂₄、*i*₄₂₅、*i*₄₂₆、*i*₄₂₇、*i*₄₂₈、*i*₄₂₉、*i*₄₃₀、*i*₄₃₁、*i*₄₃₂、*i*₄₃₃、*i*₄₃₄、*i*₄₃₅、*i*₄₃₆、*i*₄₃₇、*i*₄₃₈、*i*₄₃₉、*i*₄₄₀、*i*₄₄₁、*i*₄₄₂、*i*₄₄₃、*i*₄₄₄、*i*₄₄₅、*i*₄₄₆、*i*₄₄₇、*i*₄₄₈、*i*₄₄₉、*i*₄₅₀、*i*₄₅₁、*i*₄₅₂、*i*₄₅₃、*i*₄₅₄、*i*₄₅₅、*i*₄₅₆、*i*₄₅₇、*i*₄₅₈、*i*₄₅₉、*i*₄₆₀、*i*₄₆₁、*i*₄₆₂、*i*₄₆₃、*i*₄₆₄、*i*₄₆₅、*i*₄₆₆、*i*₄₆₇、*i*₄₆₈、*i*₄₆₉、*i*₄₇₀、*i*₄₇₁、*i*₄₇₂、*i*₄₇₃、*i*₄₇₄、*i*₄₇₅、*i*₄₇₆、*i*₄₇₇、*i*₄₇₈、*i*₄₇₉、*i*₄₈₀、*i*₄₈₁、*i*₄₈₂、*i*₄₈₃、*i*₄₈₄、*i*₄₈₅、*i*₄₈₆、*i*₄₈₇、*i*₄₈₈、*i*₄₈₉、*i*₄₉₀、*i*₄₉₁、*i*₄₉₂、*i*₄₉₃、*i*₄₉₄、*i*₄₉₅、*i*₄₉₆、*i*₄₉₇、*i*₄₉₈、*i*₄₉₉、*i*₅₀₀、*i*₅₀₁、*i*₅₀₂、*i*₅₀₃、*i*₅₀₄、*i*₅₀₅、*i*₅₀₆、*i*₅₀₇、*i*₅₀₈、*i*₅₀₉、*i*₅₁₀、*i*₅₁₁、*i*₅₁₂、*i*₅₁₃、*i*₅₁₄、*i*₅₁₅、*i*₅₁₆、*i*₅₁₇、*i*₅₁₈、*i*₅₁₉、*i*₅₂₀、*i*₅₂₁、*i*₅₂₂、*i*₅₂₃、*i*₅₂₄、*i*₅₂₅、*i*₅₂₆、*i*₅₂₇、*i*₅₂₈、*i*₅₂₉、*i*₅₃₀、*i*₅₃₁、*i*₅₃₂、*i*₅₃₃、*i*₅₃₄、*i*₅₃₅、*i*₅₃₆、*i*₅₃₇、*i*₅₃₈、*i*₅₃₉、*i*₅₄₀、*i*₅₄₁、*i*₅₄₂、*i*₅₄₃、*i*₅₄₄、*i*₅₄₅、*i*₅₄₆、*i*₅₄₇、*i*₅₄₈、*i*₅₄₉、*i*₅₅₀、*i*₅₅₁、*i*₅₅₂、*i*₅₅₃、*i*₅₅₄、*i*₅₅₅、*i*₅₅₆、*i*₅₅₇、*i*₅₅₈、*i*₅₅₉、*i*₅₆₀、*i*₅₆₁、*i*₅₆₂、*i*₅₆₃、*i*₅₆₄、*i*₅₆₅、*i*₅₆₆、*i*₅₆₇、*i*₅₆₈、*i*₅₆₉、*i*₅₇₀、*i*₅₇₁、*i*₅₇₂、*i*₅₇₃、*i*₅₇₄、*i*₅₇₅、*i*₅₇₆、*i*₅₇₇、*i*₅₇₈、*i*₅₇₉、*i*₅₈₀、*i*₅₈₁、*i*₅₈₂、*i*₅₈₃、*i*₅₈₄、*i*₅₈₅、*i*₅₈₆、*i*₅₈₇、*i*₅₈₈、*i*₅₈₉、*i*₅₉₀、*i*₅₉₁、*i*₅₉₂、*i*₅₉₃、*i*₅₉₄、*i*₅₉₅、*i*₅₉₆、*i*₅₉₇、*i*₅₉₈、*i*₅₉₉、*i*₆₀₀、*i*₆₀₁、*i*₆₀₂、*i*₆₀₃、*i*₆₀₄、*i*₆₀₅、*i*₆₀₆、*i*₆₀₇、*i*₆₀₈、*i*₆₀₉、*i*₆₁₀、*i*₆₁₁、*i*₆₁₂、*i*₆₁₃、*i*₆₁₄、*i*₆₁₅、*i*₆₁₆、*i*₆₁₇、*i*₆₁₈、*i*₆₁₉、*i*₆₂₀、*i*₆₂₁、*i*₆₂₂、*i*₆₂₃、*i*₆₂₄、*i*₆₂₅、*i*₆₂₆、*i*₆₂₇、*i*₆₂₈、*i*₆₂₉、*i*₆₃₀、*i*₆₃₁、*i*₆₃₂、*i*₆₃₃、*i*₆₃₄、*i*₆₃₅、*i*₆₃₆、*i*₆₃₇、*i*₆₃₈、*i*₆₃₉、*i*₆₄₀、*i*₆₄₁、*i*₆₄₂、*i*₆₄₃、*i*₆₄₄、*i*₆₄₅、*i*₆₄₆、*i*₆₄₇、*i*₆₄₈、*i*₆₄₉、*i*₆₅₀、*i*₆₅₁、*i*₆₅₂、*i*₆₅₃、*i*₆₅₄、*i*₆₅₅、*i*₆₅₆、*i*₆₅₇、*i*₆₅₈、*i*₆₅₉、*i*₆₆₀、*i*₆₆₁、*i*₆₆₂、

(d) 工程(b) で計算した比較定数を工程(c) で計算した比と比較する工程と、

(e) 前記比較が非類似を示した場合に、前記測定電流が前記コットレル方程式に従って変化していないことを示す信号を発する工程と、
を有することを特徴とする方法。

6. 複数の比較定数を求めるために、工程(b) で定められた比は複数の測定時間ごとに計算されることを特徴とする請求項5記載の方法。

7. 工程(c) で定められた比は、請求項6の比較定数を算出するために用いられた各測定時間ごとに測定される電流のために計算されることを特徴とする請求項6記載の方法。

8. 工程(d) は、比較定数と対応する測定時間で工程(c) にて算出された比とを比較し、工程(e) は、前記比較のいずれかが類似していない場合に信号を発することを特徴とする請求項7記載の方法。

9. 工程(b) で定められた前記比較定数はあらかじめ計算されて記憶されることを特徴とする請求項8記載の方法。

10. 反応域を流れて、その反応域にある分析対象物の濃度に依存するとともに、前記分析対象物の濃度値を示すコットレル方程式によって定義される曲線の一つに沿って変化する電流 i を測定するためのシステムにおいて、測定期間中に測定される前記分析対象物の濃度測定の正確さを確

前記電極間に電位を与える工程と、

前記電極間のサージ電流を検出する工程と、

前記流体サンプルが前記反応域に存在することを示す前記サージ電流を検出すると同時に前記電極から前記電位を除去する工程と、
を有することを特徴とする方法。

認する方法であって、

(a) 前記測定期間中の所定時間での前記電流 i の値を測定する工程と、

(b) 前記測定期間中の複数の測定時間で前記電流 i の値を測定する工程と、

(c) 前記測定期間中に移動した全電荷量の表示を導き出すために前記連続する測定時間において前記電流値を積分する工程と、

(d) 工程(b) および工程(c) で算出された前記値が、分析対象物の濃度値と類似していない場合にエラーの表示を発する工程と、
を有することを特徴とする方法。

11. 工程(d) が、

d1) 工程(a) で測定された前記電流 i の測定値を分析対象物の濃度値に変換する工程と、

d2) 前記移動した総電荷量を示す値を分析対象物の濃度値に変換する工程と、

d3) 工程d1) および工程d2) から得られた濃度値の類似性を判定するためにこれらと比較する工程と、
を含むことを特徴とする請求項10記載の方法。

12. 一対の電極間と通常は高インピーダンスを有する中間化学反応域を流れる電流 i を測定するシステムにおいて、流体サンプルを含有する分析対象物が前記反応域に存在することを判定する方法であって、

明 細 書 (翻訳文)

バイオセンシング機器および方法

発明の分野

本発明は、流体サンプルに含まれる分析対象物の濃度を定量するためのバイオセンシング機器に係り、特に血液などの体液に含まれる例えばグルコース、コレステロールなどの生体化合物の濃度を電流測定により測定するための方法および装置に関する。

関連出願の表示

本発明は、以下の発明に関連する。

1989年12月15日出願のパークス(Parks) およびホワイト(White) による「微調二股電源 (Regulated Bifurcated Power Supply)」と称する米国特許出願第07/451,107号

1989年12月15日出願のパークス(Parks) による「ノイズの減少を伴うアナログデジタル変換 (Analog to Digital Conversion With Noise Reduction)」と称する米国特許出願第07/451,212号、ならびに

1989年12月15日出願のパークス(Parks) およびホワイト(White) による「バイオセンサ電極用励起回路 (Biosensor Electrode Excitation Circuit)」と称する米国特許出願第07/451,108号

発明の背景

近年、酵素を利用したバイオセンサが血液サンプルのグルコースとコレステロールの両方の濃度の測定に利用されている。ナンカイ(Nankai)らの欧州特許出願公開第0 230 472 号には、電流滴定を利用して血液サンプルのグルコースの濃度を測定するバイオセンシング機器が開示されている。この機器では、測定電極、リファレンス電極およびカウンタ電極を備えたテストセルが用いられている。これらの電極は、グルコースオキシダーゼ、フェリシアン化カリウムおよびその他の成分を含有するインサートで覆われている。血液サンプルをインサートに接触させて入れると、サンプル中のグルコースが（グルコースオキシダーゼの作用を介して）フェリシアン化カリウムと反応してフェロシアン化カリウムを形成する。その後で電極に電圧を印加すると、逆反応が生じて、最初の反応で生じたフェロシアン化カリウムの濃度に比例した電流が流れる。この電流の測定値がサンプル中のグルコースの濃度に対応すると言われている。

グルコースとコレステロールの両方の濃度を測定する同様なシステムが、ポットゲン(Pottgen)らのPCT国際出願第 VO 89/08713号に開示されている。ナンカイらのシステム及びポットゲンらのシステムは、いずれも同一の化学反応を用いてグルコース濃度の電流滴定による検出を行っている。グルコースの場合、いずれのシステムも、グルコ

ースに対するグルコースオキシダーゼの触媒作用によって、フェリシアン化カリウム(+3)をフェロシアン化カリウム(+4)にすることができる(すなわち、正反応)。その後で反応体に電位を与えると、電気化学的に反応の逆行が生じる(すなわち、逆反応)。グルコースオキシダーゼによってグルコースが酸化されると、電子はフェリシアン化物を還元してフェロシアン化物を生じながらフェリシアン化物に移動する。電極に与えられた電位は、電極に移動される電子とともに、電気化学的にフェロシアン化物を酸化してフェリシアン化物に戻す。これによって、微量ではあるが検出可能な電流が流れる。この電流量は、サンプル中のグルコース濃度に比例する。逆反応時に流れる電流は、コットレル電流として知られ、以下の式によって表される。

$$\text{コットレル電流} = i = \frac{n F \cdot \sqrt{D} \cdot C A}{\sqrt{\pi} \cdot \sqrt{t}} \quad (1)$$

ただし、 n = 移動電子の数

F = ファラデー定数

A = 測定電極の面積

C = 分析対象物の濃度

D = 電気活性種の拡散係数

t = 時間

式(1)は、多くの因子が特定のテストシステムに対して定数になっていることが判れば、より簡略化した式に直

すことができる。このように、コットレル電流は、逆反応時のいかなる時点においても、以下の式で表せる。

$$i_t = K \cdot \frac{C}{\sqrt{t}} \quad (2)$$

$$\text{ただし、} K = \frac{n F \cdot \sqrt{D} \cdot A}{\sqrt{\pi}}$$

式(2)は、コットレル電流が分析対象物の濃度に比例し、測定時間の平方根に反比例することを示す。図3の四分割された右上領域にグルコース濃度が異なる場合の各コットレル電流を曲線で示す。

先行技術の特徴は、逆反応時に特定の時間を選択してコットレル電流を読取り、その読取り値をグルコースまたはコレステロールの濃度の測定値に変換することである。ナンカイらおよびポットゲンらはいずれも、テストセルの使用中に生じる現実的な問題を扱っていない。例えば、血液サンプルが検出電極の表面全体を覆わなければ、読取り値にエラーが生じる。さらに、テスト前またはテスト中に反応域が水和すれば、読取り値にエラーが生じる。同様に、電極の長手方向に沿ってリークが生じて血液サンプルが反応域内の電極だけでなく反応域の外部をも覆うならば、やはり、読取り値にエラーが生じる。これらのエラーは、コットレル電流のベースラインのシフトや測定時の面積の変動となって表れる。

従って、本発明の目的は、分析対象物の濃度の読取りを行うとともに誤った読取り値が正しいものとして報告されることを防止した電流滴定バイオセンサおよびその方法を提供することにある。

本発明のもう一つの目的は、間違った電流曲線が得られた場合に、エラー表示を行うグルコース濃度用の電流滴定バイオセンサおよびその方法を提供することにある。

発明の概要

測定された電流が所定のコットレル電流の関係に従って変化しているかどうかを測定するバイオセンシングシステムを説明する。このシステムは、反応域に伸長する少なくとも一対の電極を備えたテストセルを含む。この反応域は、分析対象反応体を含む。サンプルを反応域に分析対象反応体と接触させて入れた後で、アナログ信号検出器をマイクロプロセッサに組み合わせて、連続した測定時間にわたって電極間の電流測定を複数回行なう。また、マイクロプロセッサは、複数の比較定数を記憶する。この比較定数は、ある測定時間の平方根を次の測定時間の平方根で割ったものの逆数を探ることによって算出される。マイクロプロセッサは、連続する2つの測定時間を選択し、これらの時間に測定された各電流の比を算出し、これらの電流の比を、一対の連続する2つの測定時間に対してあらかじめ算出された比較定数と比較する。この比較によって、測定された電流比が比較定数に類似しないことが判った場合、電極間

の電流がコットレル関係に従って変化していないという指示が現れる。

図面の説明

図1は、バイオセンシング機器とともに用いられるテストセルの斜視図である。

図2は、図1に示す線2-2の断面図である。

図3は、図1に示すテストセルのグルコースの濃度が異なる場合に得られる電流の時間的な変化を示すグラフである。

図4は、流体サンプル中の分析対象物の濃度を測定するために使用されるテストシステムのブロック図である。

図5および図6は、図4のシステムにて使用される測定プロセスを説明するフローチャートである。

発明の詳細な説明

図1を参照すると、差込み型のテストセル10は一对の電極12および14を含む。電極12は「作用」電極と呼ばれ、望ましくは白金、パラジウムまたは他の貴金属からなるものである。電極14はリファレンス電極であり、望ましくは銀/酸化銀または銀/塩化銀からなるものである。電極12および14は、一对のポリマーシート材16および18によって挟まれ、シート材18には、電極が露出する開口部20および22が設けられている。実際は、この開口部20は、反応域または「くぼみ」になって、体液のサンプルを入れて反応を起こすようになっている。開口部22では電極12および14が露

出するので、テストセル10をコネクタに差し込むとコネクタを電極に電気的に接続することができる。

図2にテストセル10の断面を示す。製造時に、反応層24がくぼみ20に形成されて、バイオセンシング反応のための反応体を形成される。機器をグルコース濃度の測定に使用する場合、層24は、酵素、電解質、媒介物質、成膜剤および緩衝体を含む。例えば、酵素はグルコースオキシダーゼ（またはグルコースデヒドロゲナーゼ）であり、緩衝剤は有機物質や無機物質であり、電解質は塩化カリウムや塩化ナトリウムであり、媒介物質はできればフェリシアン化カリウムが好ましく、成膜剤はゼラチンおよびプロピオフィン(propiofin)を含む。テストセルをコレステロール濃度の測定に使用する場合、酵素は、コレステロールエステラーゼ添加剤の有無にかかわらずコレステロールオキシダーゼが望ましい。緩衝剤は、無機物質が望ましく、塩化カリウムまたは塩化ナトリウムなどの電解質を含む。この場合、2種類の媒介物質としてはフェリシアン化物およびキノンを用いて上述のようにゼラチン膜に入れる。

本明細書の導入部分に述べたように、このシステムで用いられる化学反応は、当該技術分野においては公知であり、詳細は説明しない。最初に血液サンプルをくぼみ20の中に入れてグルコース濃度を測定すると言え十分である。サンプル中のグルコースによって、フェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムになる正反応が生じる。正反応

が進行して完了した時、端子12および14間に電圧を印加すると、フェロシアン化カリウムがフェリシアン化カリウムに戻る逆反応によって両端子間に少量の電流が流れる。逆反応時の電子の流れは、検出して測定され、グルコース濃度に対して周知の関係を有することがわかっている。

図3に、グルコース濃度が異なる場合の電流の変化の様子を説明する。縦軸にマイクロアンペア単位の電流を採り、横軸に時間を採る。曲線30、32、34および36は、電極12と電極14との間に電位を与えて逆反応が生じた後の時間の経過に伴う電流の変化を表す。各曲線は、血液サンプルのグルコースの濃度に依存して互いに異なる軌跡をたどっていることが判る。

上述したように、電流曲線30、32、34、36などの各形状は、式(1)に基づいて決まる。もちろん、これは、テスト条件が厳密に定められたとおりに遵守されたと仮定した場合である。図1のテストセルおよびこのセルに関連した測定機器（以下、図4と関連させて説明する）は、熟練者以外の人によって使用されるように企画されているので、必要なテスト条件を満たしていないことがしばしば起こりうる。例えば、グルコースの測定を正確なものにするためには、血液サンプルをくぼみ20の中に正しく入れることが大切である。サンプルが電極面積の一部しか覆わないならば、読取り値のエラーが生じる。電極間に電圧が印加された時、電極12と電極14との間のくぼみ20が汚染されてい

ば、測定された電流曲線は、グルコース濃度に対して何の関係も有しないことがある。さらに、テストセルに欠陥があり、そこから血液サンプルの一部が漏れてシート16とシート18との間に（例えば、導体12または14の側面に沿って）浸透するならば、読取り値のエラーが生じる。コットレル電流の測定を利用した先行技術のテストセルは、このような問題を考慮しておらず、1回の測定によってコットレル電流と時間との関係が得られるものと仮定している。

上記の問題は、機器を制御するマイクロプロセッサにアルゴリズムに適した複雑な曲線を含ませることによって解決できるであろうが、フェールセーフ測定表示を有してはるかに簡単で複雑でない技術が見いだされた。式(2)から判るように、コットレル電流はいつでも測定された時間の平方根に反比例する。従って、連続する2つの測定時間 t_1 および t_2 で測定されたコットレル電流測定値は、次のように表される。

$$i_{(1)} = k \frac{C}{\sqrt{t_1}} \quad (3)$$

$$i_{(2)} = k \frac{C}{\sqrt{t_2}} \quad (4)$$

測定されたコットレル電流値の比は、次のように表される。

$$\frac{1}{1} \frac{1}{1} = \frac{\sqrt{t_2}}{\sqrt{t_1}} = x_{1,2} \quad (5)$$

式(5)から、連続する2つの時間(例えば t_1, t_2)で測定されたコットレル電流の比(例えば $x_{1,2}$)は、測定が行なわれた時間の平方根の比の逆数と同じになっていることがわかる。従って、測定時間の平方根の比の逆数($x_{1,2}$ または「比較比」と呼ばれる)は、すべてのグルコース濃度曲線に対して逆数になっている。

式(5)によって、連続した各測定時間にて測定された測定電流が前もって判らなくても、その時間の比がコットレル曲線をたどると仮定すれば定数となり、測定時間の平方根の比と同じ値を示すことを示している。もちろん、電流測定値はテスト条件によりいくらか変動するので、この比は正確に同一になることはあまりない。その結果、比を比較する際はいつでも標準偏差を考慮する必要がある。

図4にバイオセンシング機器の高水準ブロック図を示す。システム全体の制御はマイクロプロセッサ50からシステムバス52を介して出される。システムのコミュニケーションは、システムバス52とそれを介しての機器のインターフェース内の各操作ユニットに亘って生じる。信号電圧モジュール54は、マイクロプロセッサ50からのデジタルコマンドをアナログ出力に変換してライン56を介してセル10に伝える。(実施例においては、セル10は差込み型であり、縫ブラグに挿入されたときに信号電圧モジュール54からの刺激

電圧を受けるだけである。)

電流は信号検出器60によってセル10を流れ、導体58を介して戻る。この信号検出器は、順番に電流を連続的に測定し、読取り値をデジタル出力に変換する。信号検出器60は、マイクロプロセッサ50からのクロック入力によって制御され、テスト電圧がセル10に印加されると、電流読取り値を連続的に出力する。例えば、逆反応が完了するのに10秒を要する場合、この10秒間に信号検出モジュール60は500ミリ秒毎に1回の電流読取りを行なう。

ランダムアクセスメモリ(RAM)62および64は機器の操作メモリを形成する。RAM62は操作パラメータを記憶する。RAM64は、前の測定サイクルを比較の目的や入出力ポート66を介して別のプロセッサに後で読み出すために保持することができる付加的な記憶容量になっている。差込み型のリードオンリーメモリ(ROM)68は、バス52を介してインターフェースし、他のデータとともにテストセル10が取り出されたテストセルのバッチについてあらかじめ計算された比較定数($x_{1,2}, x_{2,3}$ など)を記憶している。プログラムROM72は、マイクロプロセッサを操作するソフトウェアを記憶している。さらに、一つの測定時間で測定されるコットレル電流測定値は、グルコース濃度に対して線形関係を有することが知られている。しかし、この線形関係は、セルのバッチが異なればいくらか変化する。従って、ROM68はセルのバッチごとに設けることが

でき、さらに校正定数を記憶して、コットレル電流と濃度との間の線形関係を、セルの特定のバッチごとにマイクロプロセッサ50に対して正確に定めることができる。最後に、ディスプレイ70により、ユーザーは、セル10を使用して測定された濃度測定の結果を確認することができる。

システム全体の操作は、図3を図4に組み合わせることで検討すると理解できる。まず、セル10を機器に差し込み、キー(図示せず)を押すとテストがまもなく始まることが表示される。すると、マイクロプロセッサ50は、信号電圧モジュール54を起動させて、ライン56を介してセルに「オートドロップ」電位を与える。次に、血液のサンプルないし小滴をくぼみ20に入れたら、ただちに電流スパイクが発生して血液サンプルがあることを示して信号検出モジュール60が検出する。この電流スパイクを図3に曲線80で示す。マイクロプロセッサ50は、電流スパイク80を検出すると、信号電圧モジュール54を起動させてオートドロップ電位をライン56から除去する。

この時から正反応が始まり進行して完了する(例えば約20秒)。正反応が終了した時に、マイクロプロセッサ50は信号電圧モジュール54を起動してセル10に測定電位を与えて逆反応を開始させる。ここでもまた、最初にサージ電流が発生するが、測定回路はこのサージ電流を無視する。サージ期間(例えば10)が終わると、最初の電流測定が行なわれ、その後間隔をおいて連続的に測定が行われる(例

えば t_1, t_2, t_3, \dots)。以下に述べるように、マイクロプロセッサ50は、電流測定値の一つを選択し、ROM68にて得られた定数を用いてあらかじめ校正された線形関係に基づいてグルコース濃度を計算する。さらに、マイクロプロセッサ50はすべての電流測定値を記憶し、測定時間に亘って電流測定値を積分して、逆反応時に移動した全電荷量を求める。この値は濃度に変換されて、1つの測定値に対する比較値になる。さらに、マイクロプロセッサ50は、システム中の他のモジュールと組合わせられて一連のテストを実行して、信号検出器60によって検出された信号がコットレル電流の関係に従うことを判定する。

これらの手順を図5および図6に基づいて説明する。まず、あらかじめ計算した各比較比($x_{1,2}, x_{2,3}$ など)がアクセスされて(ステップ100)記憶される。すなわち、複数の測定時間 t_1, t_2, \dots のそれぞれに対する比較比 $x_{1,2}, x_{2,3}, \dots$ がアクセスされて記憶される。次に、テストセルが挿入されてテストキーが押される。すると、システムの回路が初期化され(ステップ102)、オートドロップ電圧がセル10に印加される(ステップ104)。それから、信号検出器60は、血液サンプルがくぼみ20の中に入れられたことを示す電流スパイクに備えて待機する(ステップ106)。電流スパイクが検出されなければ、プログラムは電流スパイクが検出されるまで単に循環を繰返す(ステップ106)。この時点で、オートドロップ電圧は除去され(ステップ

108)、システムは反応が終了するまで待機する(ステップ110)。そして、測定電圧が信号電圧モジュール54からセル10に印加されて、 t_0 にて最初の電流読み取りが行われて記録される(ステップ116)。次に(図6)、次の電流読み取りが行われて(例えば t_1)記録される(ステップ118)。

この時点で、 t_0 および t_1 にて測定された電流値がアクセスされて、それらの比が算出される。そして、この比があらかじめ記憶された比較定数 x_0, \dots と比較される。これらの比が類似していなければ、測定した電流値が所定のコトレル電流の関係に従っていないことがわかる。

「類似」とは、計算した電流比があらかじめ計算した比較定数 x から所定の誤差値を含む値以外にならないことである(ステップ120)。

比較がうまく行かない場合、エラーが報告される(ステップ122)。比較がうまく行った場合、マイクロプロセッサ50が時間 $(t_1) - (t_0)$ にわたって t_0 および t_1 で測定された電流値を積分してその数値を記憶しながら、プロセスは進行する(ある期間の電流の積分値は、その期間に移動した電荷量になることを覚えておくべきである。ステップ126を参照)。測定サイクル中のある時間にサンプル測定時間が指定される。そのような時間に、その時間に測定された電流読み取り値(ステップ127)を、引き続き「サンプル」すなわちグルコースの濃度値に変換する

(ステップ134)。

次に、システムが測定サイクルの最後の時間に達したかどうかの判定を行なう(ステップ128)。達していなければ、システムは、 n の数値を増加させた後ステップ118に戻り(ステップ124)、次の時間にて次の電流読み取りを行なう。そして t_1 と t_0 との比が計算され、あらかじめ記憶された比較定数などと比較される。比較定数は、連続した測定時間で測定された電流比のためだけに計算する必要はないが、測定時間が異なる場合には計算しなければならないことを理解すべきである。

最後の電流値が測定されたと判断されると(ステップ128)、システムは積分したグルコース濃度と(ステップ130)抽出されたグルコース濃度(ステップ134)とを計算する。そして、システムは、積分計算したグルコース濃度と抽出したグルコース濃度とを比較し(ステップ136)、それらの類似性を判断し(ステップ138)、その結果をステップ140または142に示す。

上述から、一回のサンプル測定を行うことに加え、積分したサンプル測定値を算出して読み取り値の信頼性を確認するための比較が行なえることがわかる。さらに、電流比を所定の比較定数と比較することによって、このシステムが、測定された電流値が予測されたコトレル電流との関係に従ったことを正しく判定できる。従って、テストシステムまたはセルに異常があった場合、読み取り値のエラーを

回避することができる。

上述は本発明の一実施例を示したにすぎないことを理解すべきである。当業者であれば、本発明から逸脱することなく種々の変形例および適用例を考案することができる。従って、本発明は、添付の請求項に定める範囲に該当する変形例および適用例をすべて包含するものである。

図 1

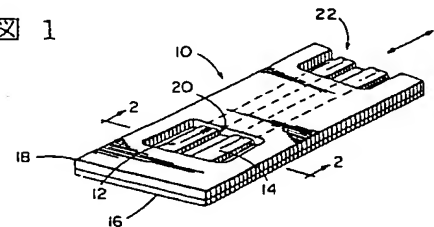


図 2

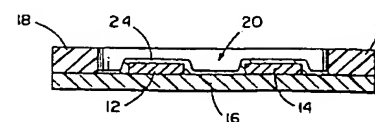


図 4

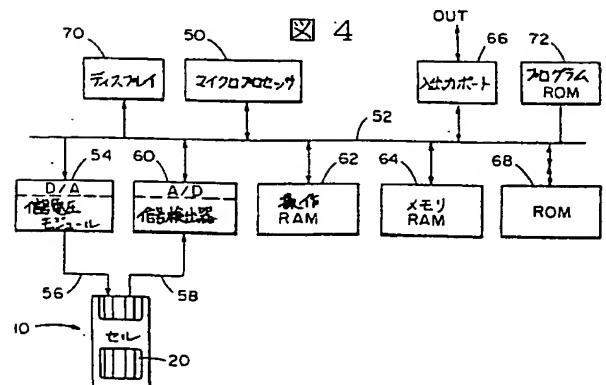


図 5

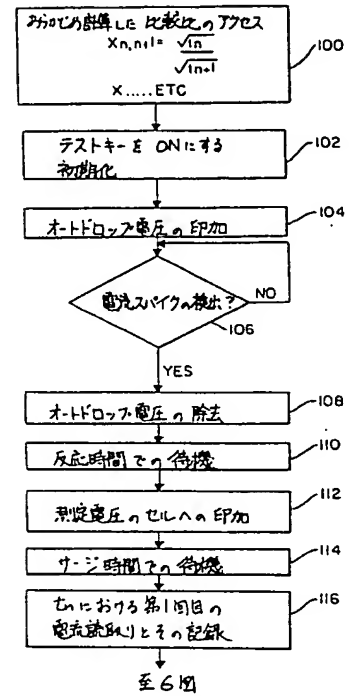


図 3

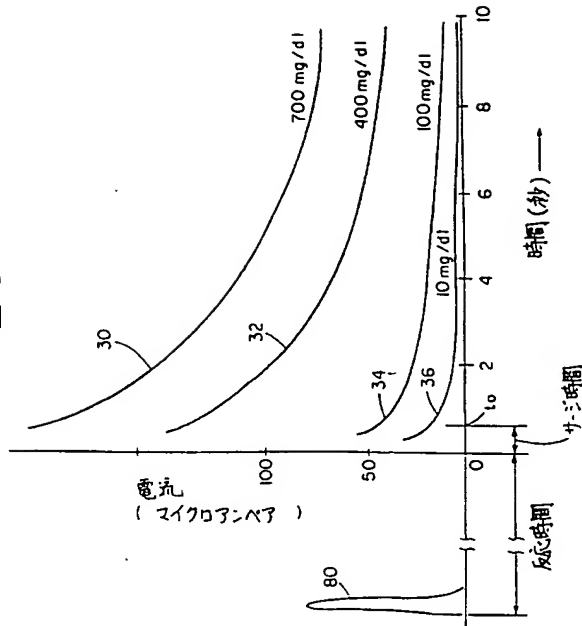
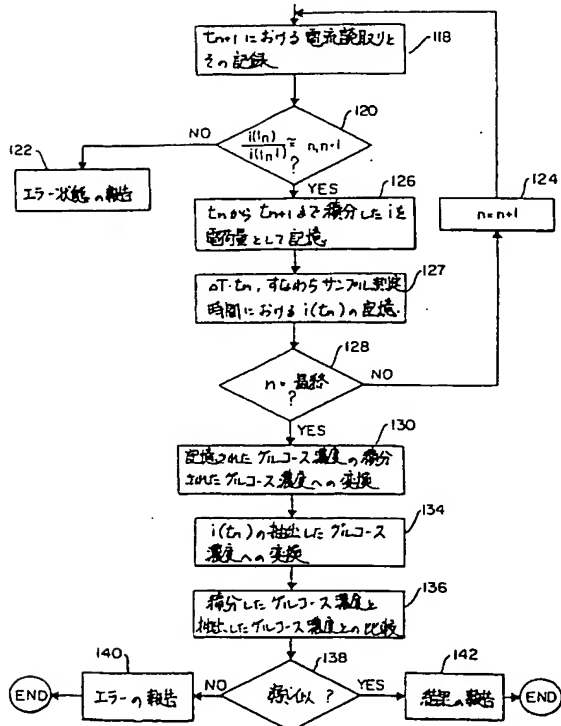


図 6



要 約 書 (翻訳文)

測定した電流が所定のコットレル電流との関係に従って変化しているかどうかを判定するバイオセンシングシステムを説明する。このシステムは、反応域に伸長する少なくとも一対の電極を備えたテストセルを含む。この反応域は、分析対象物を含む。サンプルを反応域に分析対象反応体と接触させて入れた後、アナログ信号検出器をマイクロプロセッサと組み合わせて、連続する複数の測定時間において電極間の電流測定を複数回行う。また、マイクロプロセッサは、ある測定時間の平方根を後続の測定時間の平方根で割ったものの逆数を求めて算出された連続する複数の比較定数を記憶する。マイクロプロセッサは、対をなす連続する測定時間を選択し、これらの時間にて測定された電流の比を算出し、これらの電流の比を対をなす連続する測定時間についてあらかじめ算出された比較定数と比較する。この比較によって、測定された電流の比が比較定数に類似していないことがわかった場合、電極間の電流がコットレル関係に従って変化していないという表示が出される。

また、複数の電流測定値を利用して、移動した総電荷量 Q が計算される。そして、 Q は最終的な結果を計算する第2の手段として用いることができる。

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

条約第34条に基づく補正頁(翻訳文)

平成4年5月13日

特許庁長官 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US90/07504

2. 発明の名称

バイオセンシング機器および方法

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 インディアナ州 46250
インディアナポリス ハイグ ロード 9115
名 称 ペーリンガー マンハイム コーポレーション

4. 代理人

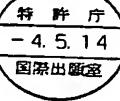
住 所 〒104 東京都中央区銀座3丁目10番9号
共同ビル(銀座3丁目) 電話: 3543-7389
氏 名 (7911) 弁理士 藤 村 元 彦
(外1名)

5. 補正書の提出年月日 1991年11月13日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



前記比較のいずれもが類似していない場合に信号を発する
ことを特徴とする請求項7記載の方法。

9. 工程(b) で定められた前記比較定数はあらかじめ計
算されて記憶されることを特徴とする請求項8記載の方法。

及び、前記算出手段は前記連続する測定時間にて測定され
た電流読取り値の比を算出し、前記比較手段は前記比を対
応する比較定数と比較し、前記システムは前記電流読取り
値が前記コットレル電流との関係に従っているかどうかを
判定することを特徴とする請求項1記載のシステム。

3. 前記テストセルは反応域で伸長する2つの電極を含
み、前記電極は分析対象反応体を含有する層によって覆わ
れていることを特徴とする請求項2記載のシステム。

5. 反応域を流れて、その反応域の分析対象物の濃度に
依存するとともに、コットレル方程式にて定義された形状
を有する曲線の一つに従って変化する電流*i*を測定するシ
ステムにおいて、前記電流がコットレル方程式に従って変
化していることを判定する方法であって、以下の工程から
なる

国際調査報告

International Search Report PCT/US90/07504

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER of special classification symbols, under the IPC		
IPC (5): G06F 15/42, G01N 27/26		
U.S. Cl.: 364/413.11; 204/401.403		
2. FIELDS SEARCHED		
Maximum Documentation Searched		
Classification System	Classification Symbols	
U.S. Cl.	364/413.07, 413.11; 204/401.403, 406; 435/817	
Documentation Searched other than Maximum Documentation is the extent that such Documents are included in the Fields Searched		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	WO, A, WO 89/08713 (POTTOEN ET AL.) 21 September 1989 Note page 10, lines 14-20 and page 16, lines 7-10	12 4
Y	US, A, 4,340,458 (LEWIS ET AL.) 20 July 1982 Note lines 45-56 of column 1 and lines 18-25 of column 2.	10, 11
A	JP, A 54-44593 (MATSUOKA) 09 April 1979 Note abstract	1-3 & 5-9
<p>* Special categories of cited documents: *</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular importance</p> <p>"E" document published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may have priority or an earlier claimant or which is cited to establish the priority date of another claimant or other document (as appropriate)</p> <p>"X" document relating to an invention, not published or otherwise known</p> <p>"Y" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"Z" document published after the international filing date but later than the priority date claimed and the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"C" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"D" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"F" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"G" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"H" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"I" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"J" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"K" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"L" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"M" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"N" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"O" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"P" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"Q" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"R" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"S" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"T" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"U" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"V" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"W" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"X" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"Y" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p> <p>"Z" document of particular importance: the document is cited to establish the priority of a claimant or to show an inventive step</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
03 March 1991	15 APR 1991	
International Searching Authority	Signature of Authorizing Officer	
ISA/US	David Bentley	

Form PCT/ISA/210 (March 1989)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.